

## 食用油脂の抗酸化に関する研究

オリーブ油オレイン酸メチルエステル・フラクションの自動酸化に  
対する卵黄セファリンの作用

浦上 智子・清原 幸子・亀山 春・田中 裕子

### ANTIOXIDANTS FOR EDIBLE OILS

#### THE BEHAVIOR OF EGG YOLK CEPHALINS IN THE AUTOXIDATION OF THE METHYL OLEATE FRACTION OF OLIVE OIL

BY CHIEKO URAKAMI, SACHIKO KIYOHARA, HARU  
KAMEYAMA AND HIROKO TANAKA

### 序 論

食用油脂及び含脂食品の抗酸化剤の作用について、基質の相違により均一な結果が得られないという根本的な問題がある。即ち動物油脂に対して抗酸化作用を示すものが植物油では示さなかったり、或は同一化合物が液状油脂と乳状含脂食品とでは全く相反する作用を示すなどである。このような問題について、最近基質中の水分、微量の脂肪酸、或は痕跡の金属（油脂の接触還元を用いられた金属触媒から来る）の影響等に関する多くの報告が見られる。然しこれらはこの複雑な問題の解明からは程遠いものである。従って抗酸化剤の作用に関しては今後益々基礎的な研究が望まれるわけで、当研究室でも食用油脂及び含脂食品の抗酸化剤として、毒性の少ないリン脂体系の化合物について一連の基礎的研究を行なって来た。

一般に油脂の抗酸化剤としては毒性の強い BHT, NDGA 等フェノール系のものが知られている。然し最近 Bishov ら<sup>1)</sup>は乳化冷凍乾燥した食品のモデルシステムでは、フェノール系のものは抗酸化作用を余り示さないが、天然リン脂体が強い作用を示したと報告し、Togashi ら<sup>2)</sup>も同様な結果を得ている。このようにリン脂体は乳化剤としてばかりでなく、抗酸化剤として改めて注目されつつある。Bishov らの用いたリン脂体は $\frac{1}{2}$ レシチン、 $\frac{1}{2}$ セファリンと $\frac{1}{3}$ イノシタイドから成る混合物で、これらのうちどれが抗酸化作用に寄与しているか明らかでない。これらのうち、レシチンは抗酸化作用を示さない事が既に報告されており<sup>3)</sup>、又当研究室でも同様な結果を得ている<sup>4)</sup>。従ってセファリンとイノシタイドが抗酸化作用に関係していると考えられる。然しセファリンに就て当研究室で得た数コの実験例<sup>5)</sup>及び抗酸化作用に関する Working hypothesis<sup>6)</sup>から考えると、液状の基質に対しては作用がないと考えられる。イノシタイドについては未だ実験は行っていないが、理論的にはかなり強い作用を示すものと考えられる。

当研究室でセファリンに関する実験が進行している間に、Haab<sup>7)</sup>の報告があつた。彼はバター油

を基質としてセファリンの作用を調べた結果、抗酸化作用があるという結果を得ている。これは当研究室で得た結果とは全く相反するものであるが、両者の間には基質の相違がある。前にも述べた如く、これは抗酸化剤の根本問題にふれる事で興味深いものがある。ここに報告する結果は Haab の結果を考慮して得たものであるから、簡単にバター油を基質とした場合について紹介して置く。

先ず基質の組成は第1表に示す如く、不飽和化合物を除去したものと、そうでないものとで前者の場合でも0.20%の不飽和化合物及び0.04%のコレステロールが存在している。前述の如く基質の微量成分が抗酸化作用に影響を及ぼす事が知られているから、このような成分がセファリン分子に及ぼす影響を無視する事は出来ない。又分析表にない微量成分、例えば、フリーの脂肪酸、蛋白質、アミノ酸等についても、考慮する必要があると考える。そこで、今回の実験ではコレステロールとグルコースの影響を調べて見た。不飽和化合物については組成が不明であるので行わなかった。グルコースの添加を試みたのは、リン脂体が水溶性の糖類やアミノ酸を溶解する性質を有するというBaer<sup>9)</sup>の報告によるものである。

第1表 バター油試料の分析値

	PL	UM	$\alpha$ -Toc	$\beta$ -C	Ch	SN	IN
試料油	%	%	mg/g	mg/g	%		
A	0	0.40	36	7.1	0.28	228	31.0
B	0	0.20	0	0	0.04	227	30.8

A バター油；B 不飽和化合物を除去したバター油；  
 PL リン脂体；UM 不飽和化合物； $\alpha$ -Toc  $\alpha$ -トコフェロール；  
 $\beta$ -C  $\beta$ -カロチン；Ch コレステロール；SN 酸価；  
 IN 沃素価

次に抗酸化剤のセファリン試料であるが、Haab は牛乳より得たセファリン及び合成 L- $\alpha$ -Dimyristoyl-phosphatidylethanolamine を用いており、後者は Baer 氏より寄贈されたものである。これは我々が前報告<sup>9)</sup>に使用したものと同一のものであると考えられる。前回の実験でこの合成セファリンを充分用いる事が出来なかったので、今回は卵黄より単離したセファリンを用いる事にした。然し卵黄セファリンは不飽和度の高い脂肪酸を有し、酸素吸収速度（即ち、酸化される事を意味する）はかなり早い事が知られている<sup>9)</sup>。そこで、この不飽和を少なくするため、接触還元を行なった。

Haab はセファリンの抗酸化作用について次ぎのような結果を得ている。バター油 50°C の自動酸化中で、0.1%のセファリンはトコフェロールより強い作用を示し、両者を添加すると相乗作用を示す。又濃度について、セファリンの0~0.8%添加は作用を増加させるが、0.8~2%では減少させる。今迄の当研究室の実験では0.1%、添加を試みていたので、今回は0.5及び0.8%の濃度を試みた。

以上二つの実験目的の外に Bishov ら<sup>11)</sup>の実験条件に見られる水分の影響を知るために、乳化基質について予備実験を行なって見た。

## 実 験

### 1. メチルオリエート (MO)

日本油脂株式会社のオリーブ油を Kepplerらの方法<sup>10)</sup>で（尿素処理法）オレイン酸フラクションを分離し、これをメタノールでエステル化し、精製した。

## 2. セフアリン

Rhodes-Leaの方法<sup>11)</sup>により（カラムクロマト法）卵黄セフアリンを得、これを更に Hanahanの方法<sup>12)</sup>により接触還元した。溶媒を溜去した後に得られた粗結晶をデオキサンから再結晶し、更にシリカゲルカラムを通して精製し、使用直前迄  $P_2O_5$  を入れた真空デシケーター中で乾燥した。基質に添加する直前に  $CHCl_3$ ：石油エーテル（2：3）の混合溶媒にとかした。リン濃度の定量からセフアリン濃度を 11.8mg/ml に調製した。

## 3. コレステロール

和光純薬工業株式会社の一級のもので、m.p. 147~150°C,  $[\alpha]_D^{20}$  -39, を用いた。

## 4. グルコース

市販の高純度のものを用いた。

## 5. 乳化試料

Methocel (Dow Chemical Co.)：水：MO2.5：25：10 の割合で混合したものをホモゲナイザーで乳化した。これをガラス玉を入れた三角フラスコに一定量入れ、秤量した。添加試料はホモゲナイズする前に加えた。

## 6. 自動酸化

液状試料の場合は前報に述べた装置<sup>9)</sup>を用い、60°C 及び 50°C で行った。乳化試料の場合はガラス玉で表面積を多くし、45°C に調節した恒温箱中で自動酸化を行つた。

## 7. パーオキシサイドの定量

液状試料の場合は前報<sup>9)</sup>の方法を用いた。乳化試料の場合も同じ沃度滴定法を用いたのであるが、自動酸化後水分の蒸発により、試料が、ガラス玉に密着しているので、これを充分溶媒中でかきまぜ、懸濁液にする必要がある。液体試料の場合と比較するため、P.V.（パーオキシサイド価）は試料100g 当りで計算した。

# 結 果

## 1. 試料について

基質 M-O の分析結果は第2表に示す通りで、リノール酸をかなり含んでおり、紫外吸収測定の結果もこれを示している。即ち 233m $\mu$  の吸収はかなり大きい。又 trienoic の吸収が 268m $\mu$  に又微量ではあるが 315m $\mu$  の吸収が見られた。リノール酸の存在率はアルカリ異性化方により求めたも



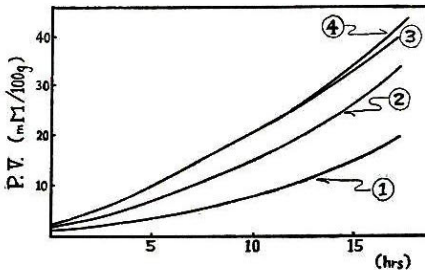
第2表 メチルオリエートの分析

	$n_D^{20}$	$\lambda_{\max} (m\mu)$	$E_{1\%}^{1cm}$
S. No.	192.2 $\pm$ 0.6	233	4.21
I. No.	99.4 $\pm$ 0.6	268	1.30
リノール酸	約1.2%	315	0.16

のである。このような基質の自動酸化速度はかなり早いものと考えられる。

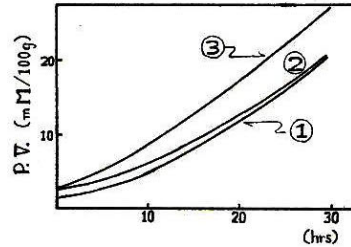
## 2. 添加物の影響

液状基質に0.1, 0.5, 及び0.8%のセファリンを添加し、60°Cで自動酸化を行つた結果は第1図に示す如く、いずれの濃度も酸化促進作用を示



第1図 60°C に於けるセファリン添加試料の P.V. 生成速度

- ① M-Oのみ
- ② M-O+0.1%セファリン
- ③ M-O+0.8%セファリン
- ④ M-O+0.5%セファリン



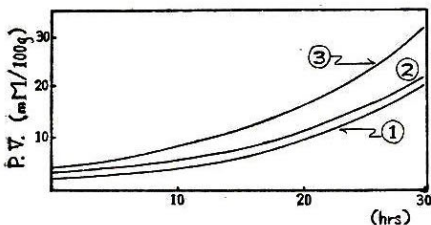
第2図 50°C におけるコレステロールとセファリン添加試料の P.V. 生成速度

- ① M-Oのみ
- ② M-O+0.054%コレステロール
- ③ M-O+0.054%コレステロール+0.1%セファリン

している。然し必ずしも濃度の増加により P.V. 生成量が増加するのではなく、0.5%と0.8%は同程度の P.V. 増加を示している。従つて以後の実験には 0.1と0.5%濃度を検討する事にした。

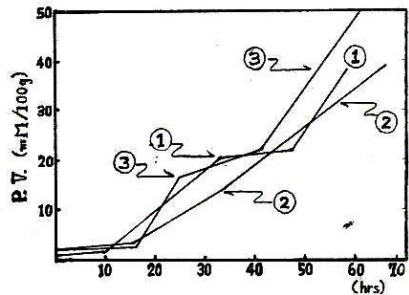
次にコレステロールのみを添加した場合、第2図に示すように、何ら影響は見られないが、同じ濃度のコレステロールに0.1%のセファリンを加えて試みた結果では、セファリンのみを添加した場合と同様(第1図)酸化促進作用が見られた。この場合50°Cを用いたのであるが、前の60°Cの場合と大差ない傾向を示した。

グルコース添加の場合は第3図に示す通りで、コレステロールの場合と同様、酸化促進は0.1%セファリンの添加によって起つたものと考えられる。



第3図 50°C におけるグルコースとセファリン添加試料の P.V. 生成速度

- ① M-Oのみ
- ② M-O+0.054%グルコース
- ③ M-O+0.054%グルコース+0.1%セファリン



第4図 45°C におけるセファリン添加の乳化試料の P.V. 生成速度

- ① M-Oのみの乳化試料
- ② 0.1%セファリン添加試料
- ③ 0.5%セファリン添加試料

従ってグルコースは、何ら影響は与えないようである。

乳化試料の場合、自動酸化中に水分が蒸発する事と、各試料の秤量に正確さを欠くために、結果は必ずしもスムーズなカーブを示さなかった。そのため第4図に示すように、結果の判定は困難であるが、40時間迄のP.V.増加から0.1%セファリン添加は抗酸化性を示している如く伺える。然し0.5%添加は影響がないようである。

## 考 察

今迄の成果から<sup>9)</sup>、リン脂体系化合物の抗酸化作用はリン酸残基によるもので、これが分子内で水素結合或は Zwitterion を形成するかどうかで、作用の強弱又は有無が示されるのではないかと考えられて来た。例えばレシチンに抗酸化作用がない事は Zwitterion によるものと考えられる。然しセファリンの場合、エタノールアミンの弱塩基性によりイオン化は弱いものであろうとされ、抗酸化作用を示すかも知れないと考えられて来た。最近1%水溶液のレシチン及びセファリンはそれぞれpH6.4と3.5を示す<sup>13)</sup>と言う報告；リン脂体のイオン形態に関する研究<sup>14)</sup>；及びOH……NはOH……Oの水素結合より強いと言う報告<sup>15a)b)</sup>等から、セファリンの Zwitterion 形態は充分考えられる。従って抗酸化作用はないか、或はあるとしても弱いであろう。然し、溶媒やその他の化合物がリン酸残基をフリーにするような影響を与えるならば、抗酸化作用を示すかも知れない(くわしい事は省略する)。このような考えの許にここで得られた結果を検討して見る。

コレステロール及びグルコースは精製メチルオリエートの液状基質中ではセファリン分子の形態に何ら影響を与えないようである。従って Haab の結果を検討するには、不鹼化物等を試みる必要があり、これは今後の問題とする。

次に乳化試料に0.1%セファリンを添加すると40時間迄では抗酸化作用を示しているようで、水分の影響があったのではないかと考えられる。これは液体試料を基質とした場合とは非常に異り、液体基質で見られた酸化促進作用をも抑えて抗酸化作用を示している点で興味がある。今後更にくわしく検討して見る考えである。

液体試料で見られた酸化促進作用は、恐らく接触還元で完全に飽和にならなかった脂肪酸残基が残っていたためと考えられる。即ち前報告<sup>6)</sup>で飽和脂肪酸を有する合成セファリンも抗酸化性を示していない事からこのように推測出来る。この点についても更に検討を加える考えである。

## 要 約

1. 接触還元した卵黄セファリンの抗酸化性をオリーブ油のメチルオリエート・フラクションを用いて調べた結果、0.5%添加を限度として酸化促進作用が見られた。

2. Haab がバター油を用いてセファリンの抗酸化作用を検討し、作用がある事を報告している<sup>7)</sup>ので、この基質に存在する不純物の影響に関して、コレステロール及びグルコースを調べたが、何ら影響は見られなかった。

3. オレイン酸メチルエステルの乳化試料を用いると、0.1%セファリン添加で、45°C 40時間迄には抗酸化作用が示された。

## 文 献

- 1) S.J. Bishov *et al.*, Food Research **25**, 174 (1960).
- 2) H.J. Togashi *et al.*, *ibid.*, **26**, 186 (1961).
- 3) H.S. Olcott and H.A. Mattill, Oil and Soap **13**, 98 (1936).
- 4) T.P. Hilditch and S. Paul, J. Soc. Chem. Ind. **58**, 21 (1939).
- 5) C. Urakami and H. Kameyama, Bull. Chem. Soc., Jpn **33**, 29 (1960).
- 6) 浦上・田中・安原・亀山：栄養・食糧 **13**, 187 (1960).
- 7) W. Haab, Milkwissenschaften **14**, 16 (1959); CA **54**, 1761h (1960).
- 8) E. Baer, J. Am. Chem. Soc. **78**, 232 (1956).
- 9) H.C. Lea, J. Sci. Food Agr. **1957**, 1.
- 10) J.G. Keppler *et al.*, J. Am. Chem. Soc., **36**, 308 (1959).
- 11) D.N. Rhodes and C.H. Lea, Biochem. J. **65**, 526 (1957).
- 12) D.J. Hanahan *et al.*, J. Am. Chem. Soc., **74**, 5070 (1952).
- 13) D.G. Dervichian, Biochem. Problems of Lipids. Proc. Second International Conf. 1955, 1.
- 14) J.E. Gorvin and M. Karbosky, J. Biol. Chem., **221**, 211 (1956).
- 15) a.H.H. Freeman, J. Am. Chem. Soc., **83**, 2900 (1961).  
b.J.W. Baker, J. Chem. Soc., **1949**, 25.

## Summary

1. Egg yolk cephalins which had been subjected to catalytic reduction showed a prooxidant activity in the methyl oleate fraction of olive oil, the activity being maximum at a concentration of 0.5%.

2. Effects of cholesterol and glucose on the activity of the cephalin sample were tested in order to check the results reported by Haab<sup>7)</sup> that synthetic as well as natural cephalins were effective antioxidants in butter oil, which contained small amounts of cholesterol and other impurities. Neither compound was found to produce any effect on the cephalin employed in the present investigation.

3. The cephalin, however, showed some antioxidant activity when incorporated into emulsified methyl oleate at a concentration of 0.1% and tested at 45°C.